烟粉虱对拟除虫菊酯杀虫剂的抗性机理

何玉仙[1]，黄　建[2]，杨秀娟[1]，翁启勇[1,*]

(1. 福建省农业科学院植物保护研究所，福州　350013；2. 福建农林大学植物保护学院，福州　350002)

摘要：通过增效剂生物测定、生化分析以及钠离子通道基因Ⅱ S4-6 cDNA 片段的 RT-PCR 扩增，探讨了烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius)对拟除虫菊酯杀虫剂的抗性机理。结果表明：对于采自田间的 6 个烟粉虱抗性品系，磷酸三苯酯(TPP)和胡椒基丁醚(PBO)对氯氰菊酯、溴氰菊酯、氯氟氰菊酯和甲氰菊酯均有显著的增效作用，而 DEM 对 4 种拟除虫菊酯杀虫剂均无明显的增效作用。烟粉虱抗性品系的 α-NA 羧酸酯酶和 β-NA 羧酸酯酶活性分别是敏感品系的 2.16～2.65 倍和 1.22～1.41 倍，抗性品系的谷胱甘肽 S 转移酶活性与敏感品系没有差异，表明羧酸酯酶和多功能氧化酶在烟粉虱对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性中具有重要的作用，而谷胱甘肽 S 转移酶与抗性无关。通过 RT-PCR 克隆了 6 个烟粉虱田间抗性品系的钠离子通道结构域Ⅱ S4-6 cDNA 片段的序列(420 bp)，发现与敏感品系相比，有 2 个位点发生突变，分别为 L925I 突变和 I917V 突变，L925I 突变在所有 6 个烟粉虱田间抗性种群中均有发生，该位点突变已被证实与拟除虫菊酯类杀虫剂密切相关，表明神经不敏感性可能是烟粉虱对拟除虫菊酯产生抗性的另一个重要因子。

关键词：烟粉虱；抗药性；拟除虫菊酯类杀虫剂；抗药性机理

中图分类号：Q965.9, S481.4　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2007)03-0241-07

Pyrethroid resistance mechanisms in *Bemisia tabaci* (Gennadius)

HE Yu-Xian[1], HUANG Jian[2], YANG Xiu-Juan[1], WENG Qi-Yong[1,*] (1. Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China; 2. College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Resistance mechanisms to pyrethroids were investigated in *Bemisia tabaci* (Gennadius) with synergist bioassay, biochemical analysis and RT-PCR amplification for Ⅱ S4-6 region of sodium channel gene. Significant synergisms by PBO and TPP but no obvious synergism by DEM to cypermethrin, deltamethrin, lambda-cyhalothrin and fenpropathrin were found in field-collected resistant strains of *B. tabaci*. The carboxylesterase (CarE) activities to α-naphthylacetate and β-naphthylacetate in the resistant strains were 2.16－2.65 and 1.22－1.41 times that in the susceptible strain respectively, but there was no difference in the GST activities among the resistant strains and the susceptible strain. This indicated that CarE and mixed function oxidase (MFO) played an important role in the resistance of *B. tabaci* to pyrethroids, while the resistance of *B. tabaci* to pyrethroids was not related to GSTs. Nucleotide and deduced amino acid sequences of Ⅱ S4-6 region of sodium channel in six different field strains of *B. tabaci* in Fujian province was amplified by reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction analysis (RT-PCR). Two mutations were identified in the Ⅱ S4-6 linker of the para-type sodium channel of *B. tabaci*: isoleucine to valine at position 917 (I917V) and leucine to isoleucine at position 925 (L925I). The L925I mutation, occurred in all six different field strains, was identified to be associated with pyrethroid resistance. This suggested that nerve insensitivity might be another mechanism of resistance to pyrethroids in *B. tabaci*.

Key words: *Bemisia tabaci*; insecticide resistance; pyrethroids; resistance mechanisms

烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius)是一种世界性　的重要害虫，目前已对有机氯、有机磷、拟除虫菊酯、

基金项目：福建省重大科技项目(2003N013)；福建省科技计划项目(2004N024)

作者简介：何玉仙，男，1968 年生，博士，副研究员，研究方向为农业昆虫与害虫防治，E-mail：hyx163@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail：zjwengqy@pub5.fz.fj.cn

收稿日期 Received：2006-07-26；接受日期 Accepted：2007-01-05

氨基甲酸酯、烟碱类、昆虫生长调节剂等主要类型杀虫剂产生不同程度的抗药性(何玉仙和黄建,2005)。近几年来,烟粉虱已成为我国农作物和花卉上的重要害虫,一些田间药剂防治试验结果发现,乐果和高效氯氰菊酯已无法对田间烟粉虱种群进行有效控制(林克剑等,2002;沈斌斌等,2004),这无疑与烟粉虱对这些药剂产生抗药性有关。

已有研究结果表明,烟粉虱对拟除虫菊酯杀虫剂的抗性机制包括酯酶、多功能氧化酶代谢作用的增强(Ishaaya *et al*.,1987;Hrowitz *et al*.,1988;Prabhaker *et al*.,1988)以及钠离子通道基因突变引起的神经敏感性下降(Morin *et al*.,2002;王利华和吴益东,2004)。我们通过增效剂生物测定、生化分析以及钠离子通道基因ⅡS4-6 cDNA 片段的 RT-PCR 扩增,探讨了烟粉虱对拟除虫菊酯杀虫剂的抗性机理。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

烟粉虱 6 个抗性品系分别为 ND-R 品系(2004 年采自福建宁德市茄子地)、FZ-R 品系(2005 年采自福州新店镇黄瓜地)、ZZ-R 品系(2005 年采自漳州龙海市茄子地)、LY-R 品系(2005 年采自龙岩市红坊镇黄瓜地)、SM-R 品系(2005 年采自三明市洋溪镇黄瓜地)、NP-R 品系(2005 年采自南平市城郊的黄瓜地);敏感品系为 SUD-S 品系(由南京农业大学植保学院吴益东教授提供,经室内长期饲养)。毒力测定及抗性机理研究所采用的试虫均为混合日龄雌成虫。

1.2 化学试剂及供试杀虫剂

90%胡椒基丁醚(Piperonyl butoxide,PBO)、99%磷酸三苯酯(Triphenyl phosphate,TPP)和 97%马来酸二乙酯(Diethyl maleate,DEM),Sigma-Aldrich 产品;还原型谷胱甘肽(GSH),Amresco 产品;1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB),Lancaster 产品;固蓝 B 盐,Fluka 产品;总 RNA 抽提试剂盒,BBI 产品;焦碳酸二乙酯 DEPC、Ultraclean™ 15 DNA 纯化回收试剂盒(MOBIO)和 Oligo d(T)14,上海生工产品;M-MuLV 反转录酶和 10 mmol/L dNTPs,Fermentas 产品;rTaq DNA 聚合酶、pMD18-T 载体和 2.5 mmol/L dNTPs,TaKaRa 产品;限制性内切酶,Promega 产品;α-乙酸萘酯(α-naphthyl acetate,α-NA)和 β-乙酸萘酯(β-naphthyl acetate,β-NA),上海试剂一厂产品;其他药品或试剂为国产分析纯或化学纯。

甲氰菊酯,20%灭扫利乳油,日本住友化学工业株式会社;溴氰菊酯,2.5%敌杀死乳油,拜耳作物科学公司;氯氰菊酯,10%氯氰菊酯乳油,红太阳集团南京第一农药厂;氯氟氰菊酯,2.5%功夫水乳剂,先正达作物保护有限公司。

1.3 增效剂 PBO、TPP 和 DEM 对杀虫剂的增效作用测定

先将增效剂 PBO、TPP 和 DEM 配制成一定浓度的丙酮溶液(含 10%乳化剂),然后分别加入到配制的杀虫剂系列浓度药液中,3 种增效剂在测定浓度范围内对供试的烟粉虱成虫均无直接毒杀作用。分别测出药剂单用及药剂与增效剂混用的 LC_{50},然后计算增效比(SR)。毒力测定方法同何玉仙等(2006)的成虫浸叶生测法。

增效比(SR)= 杀虫剂单用的 LC_{50}/(杀虫剂 + 增效剂)的 LC_{50}

1.4 羧酸酯酶(CarE)活性测定(酶标板酶动力学法)

参照 Byrne 和 Devonshire(1993)的研究方法。每个种群分别挑取 100 头烟粉虱雌成虫置于 1.5 mL Eppendorf 管中,加入 1.0 mL 0.2 mol/L(pH 6.0)的磷酸缓冲液,在冰浴中充分匀浆后,4℃ 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液稀释 10 倍作为酶源,-20℃下保存备用。

酶活性测定:取 96 孔酶标板,用八通道移液器每孔依次加入 50 μL 酶液、200 μL 底物与显色剂混合液(用 0.2 mol/L、pH 6.0 的磷酸缓冲液配制含 125 μmol/L α-NA/β-NA 和 0.6%固蓝 B 盐,混合后经过滤得到的滤液即为底物及显色剂混合液),反应总体积 250 μL,反应体系中底物终浓度 100 μmol/L。设不加酶液为空白对照,以磷酸缓冲液代替。用 Multiskan MK3 型酶标仪在 600 nm 波长下,每隔 30 s 记录 1 次光密度值,共记录 20 次,酶促反应阶段温度为 25℃。实验条件的设定和数据记录均由计算机控制,采用 DPS 统计软件进行数据处理,取光密度值 0~3.5 之间的数据计算反应速度,以反应速度表示酶活力($OD \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$)。酶源蛋白质含量测定根据 Bradford(1976)考马斯亮蓝法进行。

米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_{max})测定:在 96 孔酶标板中,每孔依次加入 50 μL 酶液、100 μL 系列浓度的底物(α-NA/β-NA)和 100 μL 显色剂(0.6%固蓝 B 盐)。实验条件和步骤同酶活性测定,根据 Lineweaver-Burk 作图法求 K_m 和 V_{max}。

1.5 谷胱甘肽 S 转移酶（GSTs）活性测定（酶标板酶动力学法）

每个种群分别挑取 100 头烟粉虱雌成虫，加入 1.0 mL 0.06 mol/L（pH 7.0）磷酸缓冲液，在冰浴中充分匀浆后，4℃ 10 000 r/min 下离心 10 min，取上清液作为酶源，－20℃下保存备用。取 96 孔酶标板，用八通道移液器每孔依次加入 20 μL 20 mmol/L CDNB、40 μL 40 mmol/L GSH、90 μL 磷酸缓冲液、50 μL 酶液，设不加酶液空白对照，以磷酸缓冲液代替。反应总体积 200 μL。迅速用 Multiskan MK3 型酶标仪在 340 nm 波长下每 30 s 记录 1 次光密度值，共记录 20 次。酶促反应阶段温度为 25℃，采用 DPS 统计软件进行数据统计，以反应速度表示酶活力（$OD \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$）。

1.6 钠离子通道基因Ⅱ S4-6 片段 RT-PCR 扩增

用 BBI 公司的总 RNA 提取试剂盒，分别提取各品系烟粉虱雌、雄虫总 RNA。以提取的总 RNA 为模板，Oligo d（T）$_{14}$ 为引物，在反转录酶 M-MuLV 的作用下合成第 1 链 cDNA，然后以合成的 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增。根据 GenBank 中注册的烟粉虱 SUD-S 品系钠离子通道基因结构域Ⅱ cDNA 序列（注册号：AJ440727）设计 1 对引物：上游引物为 5′-GCCAAATCCTGGCCAACTTT-3′，下游引物为 5′-TTTGTTTGTTTCGTTGTCAGC-3′，扩增产物大小约 420 bp。PCR 反应系统体积为 25 μL，内含 10×PCR 缓冲液（含 20 mmol/L 的 Mg^{2+}）2.5 μL；rTaq DNA 聚合酶（5 U/μL）0.2 μL；2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL；上下游引物（10 pmol/L）各 2.0 μL；cDNA 3.0 μL；ddH_2O 13.3 μL。反应体系于 94℃预变性 3 min，然后 94℃变性 1 min、55℃退火 1 min、72℃延伸 2 min，进行 35 个循环，最后一个循环结束后 72℃继续延伸 10 min。采用 pMD18-T 载体克隆目标片段，克隆产物送英骏生物技术有限公司测序，每个种群测 2 个克隆，测序结果采用 DNAmen 分析软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 增效剂对 4 种拟除虫菊酯杀虫剂的增效作用

TPP、PBO 和 DEM 对 4 种拟除虫菊酯杀虫剂的增效作用测定结果显示，对采自田间的抗性种群，TPP 和 PBO 对氯氰菊酯、溴氰菊酯、氯氟氰菊酯和甲氰菊酯的增效作用极为显著，对敏感品系没有明显的增效作用，DEM 对上述 4 种杀虫剂均无明显的增效作用（表 1）。表明烟粉虱对拟除虫菊酯杀虫剂的抗性与羧酸酯酶和多功能氧化酶的关系密切，与谷胱甘肽 S 转移酶的关系不大。

表 1　PBO、TPP 和 DEM 对氯氰菊酯、氯氟氰菊酯、溴氰菊酯和甲氰菊酯的增效作用

Table 1　The synergism of PBO，TPP and DEM to cypermethrin，lambda-cyhalothrin，deltamethrin and fenpropathrin

品系 Strains	药剂 Insecticides	$b \pm SE$	LC_{50} (mg/L) (95% FL)	抗性倍数 RR	增效比 SR
SUD-S	氯氰菊酯 Cypermethrin	1.45 ± 0.18	17.81（13.50 – 22.52）	1.0	–
	Cypermethrin + TPP	1.37 ± 0.13	15.40（12.29 – 19.08）		1.16
	Cypermethrin + PBO	1.22 ± 0.13	12.31（9.37 – 15.63）		1.44
ND-R	氯氰菊酯 Cypermethrin	2.84 ± 0.31	2 127.42（1 789.64 – 2 441.28）	119.45	–
	Cypermethrin + TPP	1.77 ± 0.20	39.42（31.57 – 48.05）	2.21	53.97
	Cypermethrin + PBO	2.04 ± 0.20	51.33（43.24 – 61.05）	2.88	41.45
	Cypermethrin + DEM	2.17 ± 0.29	1 609.75（1 208.17 – 1 955.29）	90.38	1.32
LY-R	氯氰菊酯 Cypermethrin	2.37 ± 0.23	2 066.30（1 789.82 – 2 443.69）	116.02	–
	Cypermethrin + TPP	1.29 ± 0.17	35.52（26.37 – 45.52）	1.99	59.04
	Cypermethrin + PBO	1.72 ± 0.19	163.36（132.10 – 212.60）	9.17	12.65
NP-R	氯氰菊酯 Cypermethrin	1.77 ± 0.19	2 892.66（2 444.40 – 3 475.12）	162.42	–
	Cypermethrin + TPP	1.17 ± 0.13	35.24（27.16 – 45.71）	1.98	82.08
	Cypermethrin + PBO	0.68 ± 0.13	159.62（103.82 – 294.39）	8.96	18.12
ZZ-R	氯氰菊酯 Cypermethrin	1.28 ± 0.21	4 743.77（3 697.24 – 6 757.62）	266.35	–
	Cypermethrin + TPP	0.88 ± 0.17	86.94（60.13 – 150.85）	4.88	54.56
	Cypermethrin + PBO	1.40 ± 0.18	330.43（260.88 – 434.35）	18.55	14.36
SM-R	氯氰菊酯 Cypermethrin	1.57 ± 0.23	2 381.31（1 858.98 – 2 921.98）	113.71	–
	Cypermethrin + TPP	1.36 ± 0.20	12.34（6.17 – 18.57）	0.69	192.97
	Cypermethrin + PBO	1.20 ± 0.17	103.85（79.96 – 135.69）	5.83	22.93

续表 1 Table 1 continued

品系 Strains	药剂 Insecticides	$b \pm SE$	LC_{50} (mg/L) (95% FL)	抗性倍数 RR	增效比 SR
FZ-R	**氯氰菊酯** Cypermethrin	2.41 ± 0.25	3 153.47(2 736.28 – 3 645.38)	177.06	–
	Cypermethrin + TPP	1.10 ± 0.16	39.34(28.61 – 51.77)	2.21	80.16
	Cypermethrin + PBO	1.23 ± 0.17	109.39(83.11 – 141.13)	6.14	28.83
SUD-S	**氯氟氰菊酯** Lambda-cyhalothrin	1.77 ± 0.16	1.10(0.86 – 1.34)	1.0	–
	Lambda-cyhalothrin + TPP	1.33 ± 0.18	1.04(0.77 – 1.33)		1.06
	Lambda-cyhalothrin + PBO	1.34 ± 0.14	0.93(0.66 – 1.20)		1.18
ND-R	**氯氟氰菊酯** Lambda-cyhalothrin	1.84 ± 0.23	1 022.15(857.36 – 1 263.39)	929.23	–
	Lambda-cyhalothrin + TPP	1.29 ± 0.14	3.01(2.31 ~ 3.79)	2.74	339.58
	Lambda-cyhalothrin + PBO	1.06 ± 0.11	10.58(8.11 – 14.43)	9.62	96.61
	Lambda-cyhalothrin + DEM	1.28 ± 0.18	781.93(604.92 – 1 048.30)	710.84	1.31
SUD-S	**溴氰菊酯** Deltamethrin	1.63 ± 0.19	8.72(7.02 – 11.27)	1.0	–
	Deltamethrin + TPP	1.38 ± 0.18	7.10(5.62 – 9.12)		1.23
	Deltamethrin + PBO	1.60 ± 0.18	6.90(5.62 – 8.55)		1.26
ND-R	**溴氰菊酯** Deltamethrin	2.36 ± 0.25	712.89(613.74 – 823.10)	81.75	–
	Deltamethrin + TPP	1.57 ± 0.19	3.83(2.88 – 4.80)	0.44	186.62
	Deltamethrin + PBO	1.58 ± 0.15	28.96(22.89 – 35.55)	3.32	24.62
	Deltamethrin + DEM	2.26 ± 0.20	695.56(608.24 – 803.81)	79.77	1.02
LY-R	**溴氰菊酯** Deltamethrin	2.71 ± 0.37	1 017.30(870.73 – 1 285.92)	116.66	–
	Deltamethrin + TPP	0.91 ± 0.13	4.23(2.67 – 5.92)	0.49	240.50
	Deltamethrin + PBO	0.60 ± 0.15	34.13(20.67 – 69.57)	3.91	29.81
NP-R	**溴氰菊酯** Deltamethrin	3.94 ± 0.37	999.08(912.05 – 1 100.22)	114.57	–
	Deltamethrin + TPP	0.93 ± 0.13	4.05(2.52 – 5.71)	0.46	246.69
	Deltamethrin + PBO	0.90 ± 0.13	32.85(23.65 – 48.99)	3.77	30.41
ZZ-R	**溴氰菊酯** Deltamethrin	3.50 ± 0.33	1 082.82(983.19 – 1 205.78)	124.18	–
	Deltamethrin + TPP	1.20 ± 0.13	7.20(5.55 – 9.15)	0.83	150.39
	Deltamethrin + PBO	1.17 ± 0.18	28.40(17.88 – 38.80)	3.26	38.13
SM-R	**溴氰菊酯** Deltamethrin	3.05 ± 0.27	1016.42(911.02 – 1 153.43)	116.56	–
	Deltamethrin + TPP	1.31 ± 0.15	2.78(1.78 – 3.80)	0.32	365.62
	Deltamethrin + PBO	1.24 ± 0.14	12.19(9.62 – 15.95)	1.40	83.38
FZ-R	**溴氰菊酯** Deltamethrin	3.13 ± 0.32	968.50(869.29 – 1 083.18)	111.07	–
	Deltamethrin + TPP	1.19 ± 0.13	8.56(6.70 – 10.91)	0.98	113.14
	Deltamethrin + PBO	1.14 ± 0.17	20.57(12.42 – 28.59)	2.36	47.08
SUD-S	**甲氰菊酯** Fenpropathrin	1.92 ± 0.19	4.92(4.16 – 5.88)	1.0	–
	Fenpropathrin + TPP	1.48 ± 0.14	4.17(3.40 – 5.16)		1.18
	Fenpropathrin + PBO	1.43 ± 0.14	3.92(3.18 – 4.88)		1.25
ND-R	**甲氰菊酯** Fenpropathrin	1.77 ± 0.23	1 876.59(1 266.96 – 2 424.62)	381.42	–
	Fenpropathrin + TPP	2.27 ± 0.20	16.89(13.48 – 20.26)	3.43	111.11
	Fenpropathrin + PBO	1.98 ± 0.20	32.82(26.45 – 39.39)	6.67	57.18
	Fenpropathrin + DEM	1.36 ± 0.23	1 029.88(451.37 – 1 595.85)	209.33	1.82

2.2 烟粉虱不同品系羧酸酯酶和谷胱甘肽 S 转移酶活性比较

为了进一步证实羧酸酯酶和谷胱甘肽 S 转移酶与烟粉虱抗药性的关系，对烟粉虱抗性品系和敏感品系的羧酸酯酶和谷胱甘肽 S 转移酶进行了研究。表 2 结果显示，烟粉虱抗性品系的 α-NA 羧酸酯酶活性是敏感品系的 2.16 ~ 2.65 倍，抗性品系的 β-NA 羧酸酯酶活性是敏感品系的 1.22 ~ 1.41 倍；烟粉虱抗性品系的谷胱甘肽 S 转移酶活性与敏感品系基本相近。表 3 结果显示，烟粉虱抗性品系 α-NA 羧酸酯酶和 β-NA 羧酸酯酶的 V_{max} 值分别是敏感品系的 2.65 倍和 1.32 倍，但抗性品系羧酸酯酶对 α-NA 和 β-NA 正常底物的亲和力（K_m 值）与敏感品系基本相近。表明烟粉虱的抗性与羧酸酯酶量的增加有关，烟粉虱抗性品系羧酸酯酶没有发生质的变化；烟粉虱的抗性与谷胱甘肽 S 转移酶关系不大。

表 2　烟粉虱不同品系羧酸酯酶、谷胱甘肽 S 转移酶活性的比较

Table 2　Comparison of the activities of CarE and GSTs in different strains of *Bemisia tabaci*

品系 Strains	羧酸酯酶 CarE α-NA 活性 Activity ($OD \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$) (mean ± *SE*)	R/S	羧酸酯酶 CarE β-NA 活性 Activity ($OD \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$) (mean ± *SE*)	R/S	谷胱甘肽 S 转移酶 GSTs 活性 Activity ($OD \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$) (mean ± *SE*)	R/S
SUD-S	1.67 ± 0.15		4.33 ± 0.14		5.07 ± 0.33	
FZ-R	4.22 ± 0.26	2.53	5.29 ± 0.19	1.22	5.52 ± 0.34	1.09
ZZ-R	4.43 ± 0.17	2.65	6.09 ± 0.24	1.41	5.71 ± 0.38	1.12
LY-R	4.02 ± 0.22	2.41	5.68 ± 0.17	1.31	5.11 ± 0.25	1.01
SM-R	3.92 ± 0.15	2.35	5.32 ± 0.15	1.23	5.61 ± 0.36	1.11
NP-R	3.95 ± 0.25	2.37	6.03 ± 0.21	1.39	5.45 ± 0.21	1.07
ND-R	3.60 ± 0.15	2.16	5.59 ± 0.12	1.29	5.20 ± 0.14	1.03

表 3　烟粉虱不同品系羧酸酯酶的 V_{max} 和 K_m 比较

Table 3　Comparison of the maximal velocity (V_{max}) and Michaelis-Menten constant (K_m) of CarE in different strains of *Bemisia tabaci*

品系 Strains	α-NA V_{max} ± *SE* ($OD \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$)	R/S	α-NA K_m ± *SE* (μmol/L)	R/S	β-NA V_{max} ± *SE* ($OD \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$)	R/S	β-NA K_m ± *SE* (μmol/L)	R/S
SUD-S	7.23 ± 1.62	1.00	418.94 ± 5.24	1.00	7.49 ± 1.56	1.00	82.02 ± 7.44	1.00
ZZ-R	19.17 ± 3.30	2.65	487.66 ± 11.18	1.16	9.92 ± 2.42	1.32	81.05 ± 9.18	0.99

2.3　烟粉虱钠离子通道基因 Ⅱ S4-6 片段的序列分析

通过 RT-PCR 获得了烟粉虱各抗性品系钠离子通道结构域 Ⅱ S4-6 cDNA 片段的序列(420 bp)，并与 SUD-S 品系的相应序列进行比较(图 1)。从图 1 中可以发现，与 SUD-S 品系相比所有抗性品系均在第 61 位点和第 390 位点上出现碱基差异，其中第 390 位点的碱基突变出现在密码子的第 3 个碱基，故不造成氨基酸变异，而第 61 位点的碱基突变导致氨基酸由亮氨酸变异为异亮氨酸，相当于家蝇钠离子通道序列第 925 位氨基酸由亮氨酸变异为异亮氨酸(L925I)，该突变位点相当于家蝇抗拟除虫菊酯品系钠离子通道 Super-kdr 突变，因此推测 L925I 突变在烟粉虱对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性产生可能具有重要作用。此外，与敏感品系相比，NP-R 品系在第 54 位点出现碱基突变(T→C)，但不造成氨基酸突变；FZ-R 品系在第 37 位点出现碱基突变(A→G)，并造成氨基酸突变，该位点突变相当于家蝇钠离子通道序列第 917 位氨基酸由异亮氨酸变异为缬氨酸(I917V)。

3　讨论

拟除虫菊酯的酯键水解是生物体内一个主要的代谢途径，特别是在对拟除虫菊酯的抗性昆虫中，大多数都与水解代谢增加有关，这种水解代谢的酶系就是羧酸酯酶(高希武和郑炳宗，1991)；郑炳宗等(1988)研究发现，瓜蚜对拟除虫菊杀虫剂的抗性与羧酸酯酶活性增加有关；谭维嘉等(1988)研究认为，棉蚜对溴氰菊酯的不敏感性与羧酸酯酶存在一定的相关性；多功能氧化酶(MFO)则被证实是昆虫对拟除虫菊酯类杀虫剂抗药性发展过程中极为重要的作用机制，唐振华和周成理(1992)以及周成理等(1993)研究认为，小菜蛾对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性与多功能氧化酶有着密切关系，吴益东等(1995)研究认为，多功能氧化酶解毒作用增强是棉铃虫对氰戊菊酯产生抗药性的主要原因。

关于酯酶和多功能氧化酶在烟粉虱抗药性中的作用，Hrowitz 等(1988)通过增效剂增效试验，发现增效剂 DEF 对氯氰菊酯和氯菊酯具有显著的增效作用，说明酯酶与烟粉虱对拟除虫菊酯的抗性有关。Dittrich 等(1990)研究发现危地马拉和尼加拉瓜烟粉

```
        A  K  S  W   P  T  L   N  L  L   I  S I/V M   G  R  T   V  G  A
SUD-S   GCCAAATCCT GGCCAACTTT GAATCTGTTG ATTTCAATCA TGGGCCGAAC AGTTGGGGCC   60
SM-R    GCCAAATCCT GGCCAACTTT GAATCTGTTG ATTTCAATCA TGGGCCGAAC AGTCGGGGCC   60
NP-R    GCCAAATCCT GGCCAACTTT GAATCTGTTG ATTTCAATCA TGGGCCGAAC AGTTGGGGCC   60
LY-R    GCCAAATCCT GGCCAACTTT GAATCTGTTG ATTTCAATCA TGGGCCGAAC AGTTGGGGCC   60
ZZ-R    GCCAAATCCT GGCCAACTTT GAATCTGTTG ATTTCAATCA TGGGCCGAAC AGTTGGGGCC   60
FZ-R    GCCAAATCCT GGCCAACTTT GAATCTGTTG ATTTCAGTCA TGGGCCGAAC AGTTGGGGCC   60
ND-R    GCCAAATCCT GGCCAACTTT GAATCTGTTG ATTTCAATCA TGGGCCGAAC AGTTGGGGCC   60
        L/I G N L  T  F  V   L  C  I   I  I  F  I   F  A  V   M  G  M
        TTAGGAAATT TGACTTTTGT TTTGTGTATC ATTATTTTCA TTTTTGCTGT GATGGGAATG  120
        ATAGGAAATT TGACTTTTGT TTTGTGTATC ATTATTTTCA TTTTTGCTGT GATGGGAATG  120
        ATAGGAAATT TGACTTTTGT TTTGTGTATC ATTATTTTCA TTTTTGCTGT GATGGGAATG  120
        ATAGGAAATT TGACTTTTGT TTTGTGTATC ATTATTTTCA TTTTTGCTGT GATGGGAATG  120
        ATAGGAAATT TGACTTTTGT TTTGTGTATC ATTATTTTCA TTTTTGCTGT GATGGGAATG  120
        ATAGGAAATT TGACTTTTGT TTTGTGTATC ATTATTTTCA TTTTTGCTGT GATGGGAATG  120
        ATAGGAAATT TGACTTTTGT TTTGTGTATC ATTATTTTCA TTTTTGCTGT GATGGGAATG  120
         Q  L  F  G   K  N  Y   T  D  N   V  D  R  F   P  G  G   E  L  P
        CAACTATTCG GGAAGAATTA TACAGACAAT GTTGATCGCT TTCCTGGCGG AGAACTACCT  180
        CAACTATTCG GGAAGAATTA TACAGACAAT GTTGATCGCT TTCCTGGCGG AGAACTACCT  180
        CAACTATTCG GGAAGAATTA TACAGACAAT GTTGATCGCT TTCCTGGCGG AGAACTACCT  180
        CAACTATTCG GGAAGAATTA TACAGACAAT GTTGATCGCT TTCCTGGCGG AGAACTACCT  180
        CAACTATTCG GGAAGAATTA TACAGACAAT GTTGATCGCT TTCCTGGCGG AGAACTACCT  180
        CAACTATTCG GGAAGAATTA TACAGACAAT GTTGATCGCT TTCCTGGCGG AGAACTACCT  180
        CAACTATTCG GGAAGAATTA TACAGACAAT GTTGATCGCT TTCCTGGCGG AGAACTACCT  180
         R  W  N  F   T  D  F   M  H  S   F  M  I  V   F  R  V   L  C  G
        CGGTGGAATT TTACTGACTT CATGCACTCA TTCATGATCG TTTTTCGAGT CCTCTGCGGA  240
        CGGTGGAATT TTACTGACTT CATGCACTCA TTCATGATCG TTTTTCGAGT CCTCTGCGGA  240
        CGGTGGAATT TTACTGACTT CATGCACTCA TTCATGATCG TTTTTCGAGT CCTCTGCGGA  240
        CGGTGGAATT TTACTGACTT CATGCACTCA TTCATGATCG TTTTTCGAGT CCTCTGCGGA  240
        CGGTGGAATT TTACTGACTT CATGCACTCA TTCATGATCG TTTTTCGAGT CCTCTGCGGA  240
        CGGTGGAATT TTACTGACTT CATGCACTCA TTCATGATCG TTTTTCGAGT CCTCTGCGGA  240
        CGGTGGAATT TTACTGACTT CATGCACTCA TTCATGATCG TTTTTCGAGT CCTCTGCGGA  240
         E  W  I  E   S  M  W   D  C  M   H  V  G  D   V  S  C   I  P  F
        GAATGGATTG AGTCCATGTG GGACTGTATG CATGTTGGTG ATGTGTCCTG TATTCCTTTT  300
        GAATGGATTG AGTCCATGTG GGACTGTATG CATGTTGGTG ATGTGTCCTG TATTCCTTTT  300
        GAATGGATTG AGTCCATGTG GGACTGTATG CATGTTGGTG ATGTGTCCTG TATTCCTTTT  300
        GAATGGATTG AGTCCATGTG GGACTGTATG CATGTTGGTG ATGTGTCCTG TATTCCTTTT  300
        GAATGGATTG AGTCCATGTG GGACTGTATG CATGTTGGTG ATGTGTCCTG TATTCCTTTT  300
        GAATGGATTG AGTCCATGTG GGACTGTATG CATGTTGGTG ATGTGTCCTG TATTCCTTTT  300
        GAATGGATTG AGTCCATGTG GGACTGTATG CATGTTGGTG ATGTGTCCTG TATTCCTTTT  300
         F  L  A  T   V  V  T   G  Y  L   V  V  L  N   L  F  L   A  L  L
        TTTTTAGCCA CTGTCGTTAT CGGTTACCTT GTAGTTTTAA ATCTTTTCTT AGCGTTGTTG  360
        TTTTTAGCCA CTGTCGTTAT CGGTTACCTT GTAGTTTTAA ATCTTTTCTT AGCGTTGTTG  360
        TTTTTAGCCA CTGTCGTTAT CGGTTACCTT GTAGTTTTAA ATCTTTTCTT AGCGTTGTTG  360
        TTTTTAGCCA CTGTCGTTAT CGGTTACCTT GTAGTTTTAA ATCTTTTCTT AGCGTTGTTG  360
        TTTTTAGCCA CTGTCGTTAT CGGTTACCTT GTAGTTTTAA ATCTTTTCTT AGCGTTGTTG  360
        TTTTTAGCCA CTGTCGTTAT CGGTTACCTT GTAGTTTTAA ATCTTTTCTT AGCGTTGTTG  360
        TTTTTAGCCA CTGTCGTTAT CGGTTACCTT GTAGTTTTAA ATCTTTTCTT AGCGTTGTTG  360
         L  S  N  F   G  S  S   S  L  S   A  P  T  A   D  N  E   T  N  K
        CTGAGTAATT TCGGATCATC AAGCTTATCG GCGCCAACAG CTGACAACGA AACAAACAAA  420
        CTGAGTAATT TCGGATCATC AAGCTTATCT GCGCCAACAG CTGACAACGA AACAAACAAA  420
        CTGAGTAATT TCGGATCATC AAGCTTATCT GCGCCAACAG CTGACAACGA AACAAACAAA  420
        CTGAGTAATT TCGGATCATC AAGCTTATCT GCGCCAACAG CTGACAACGA AACAAACAAA  420
        CTGAGTAATT TCGGATCATC AAGCTTATCT GCGCCAACAG CTGACAACGA AACAAACAAA  420
        CTGAGTAATT TCGGATCATC AAGCTTATCT GCGCCAACAG CTGACAACGA AACAAACAAA  420
        CTGAGTAATT TCGGATCATC AAGCTTATCT GCGCCAACAG CTGACAACGA AACAAACAAA  420
```

图 1 烟粉虱抗性品系与敏感品系钠离子通道结构域 Ⅱ S4-6 区段的碱基序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the domain Ⅱ S4-6 region of sodium channel in the resistant strains and the susceptible strain of *Bemisia tabaci*

虱种群存在较高的非特异性酯酶活性和多功能氧化酶活性。Byrne 和 Devonshire（1993）研究发现烟粉虱抗性种群的酯酶活性是敏感种群的 10 倍，这也是其对氰戊菊酯产生抗性的原因。我们从增效作用的实验结果可以看出，羧酸酯酶专一性抑制剂 TPP 和多功能氧化酶专一性抑制剂 PBO 在烟粉虱田间抗性品系中对拟除虫菊酯杀虫剂氯氟氰菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯、溴氰菊酯均表现出显著的增效作用。另外，从生化分析结果进一步发现烟粉虱田间抗性品系羧酸酯酶对 α-NA 和 β-NA 的水解活性明显高于敏感品系，表明烟粉虱对拟除虫菊酯杀虫剂的抗性与羧酸酯酶和多功能氧化酶的解毒作用密切相关。但这还难以解释烟粉虱田间抗性种群对拟除虫菊酯几百上千倍的抗性水平（对氯氟氰菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯和溴氰菊酯的抗性分别高达 838.38 ~ 2 460.52倍、244.64 ~ 834.29 倍、116.02 ~ 266.35 倍和 81.75 ~ 124.18 倍），不能排除其他抗性机理（神经不敏感性等）的参与。

拟除虫菊酯类杀虫剂作用于昆虫神经系统钠离子通道，钠离子通道氨基酸突变导致钠离子通道对药剂敏感性下降是昆虫对拟除虫菊酯类杀虫剂产生抗药性的主要机理，这种抗性机制被称为击倒抗性（knock down resistance，Kdr），目前已在 13 种农业害虫和卫生害虫中发现与拟除虫菊酯类杀虫剂抗性相

关的钠离子通道氨基酸突变（Soderlund and Knipple，2003）。我们通过 RT-PCR 克隆了福建 6 个烟粉虱田间抗性品系的钠离子通道结构域Ⅱ S4-6 cDNA 片段，发现 6 个抗性品系的钠离子通道结构域Ⅱ S4-6 cDNA 片段均发生了 L925I 突变，该位点突变已被研究证实与烟粉虱对拟除虫菊酯杀虫剂的抗性密切相关（Morin *et al*.，2002；王利华和吴益东，2004）。此外，福州种群的钠离子通道还出现 I917V 突变，由于该位点突变在其他田间抗性种群中并没有普遍性，因此其是否与烟粉虱对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性有关有待进一步研究。

综合以上研究结果，认为烟粉虱田间种群对拟除虫菊酯杀虫剂的高水平抗性是多因子的，除了多功能氧化酶和羧酸酯酶的解毒作用这一重要因子外，神经不敏感因子可能也起着重要的作用。

参 考 文 献（References）

Bradford MM，1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*.，72：248－254.

Byrne FJ，Devonshire AL，1993. Insensitive acetylcholinesterase and esterase polymorphism in susceptible and resistant population of the tobacco whitefly *Bemisia tabaci*（Genn.）. *Pesticide Biochemistry and Physiology*，45（1）：34－42.

Dittrich V，Ernst GH，Ruesch O，Uk S，1990. Resistance mechanisms in sweetpotato whitefly（Homoptera：Aleyrodidae）populations from Sudan，Turkey，Guatemala，and Nicaragua. *J. Econ. Entomol*.，83（5）：1 665－1 670.

Gao XW，Zheng BZ，1987. Synergism of inhibitors of carboxylesterase to pyrethroid insecticides in aphids. *Acta Agriculturae Universitatis Pekinensis*，17（4）：89－94.［高希武，郑炳宗，1991. 几种农药对蚜虫羧酸酯酶的抑制和拟除虫菊酯的增效. 北京农业大学学报，17（4）：89－94］

He YX，Huang J，2005. Advance of insecticide resistance in *Bemisia tabaci*. *Entomological Journal of East China*，14（4）：336－342.［何玉仙，黄建，2005. 烟粉虱抗药性的研究进展. 华东昆虫学报，14（4）：336－342］

He YX，Liang ZS，Lin GJ，Wu DD，Huang J，2006. Bioassay for neonicotinoid resistance in adults of *Bemisia tabaci*. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University*，35（2）：143－146.［何玉仙，梁智生，林桂君，吴咚咚，黄建，2006. 烟粉虱成虫对烟碱类杀虫剂抗性的生物测定方法. 福建农林大学学报，35（2）：143－146］

Hrowitz AR，Toscano NC，Youngman RR，Georghiou GP，1988. Synergism of insecticides with DEF in sweetpotato whitefly（Homoptera：Aleyrodidae）. *J. Econ. Entomol*.，81（1）：110－114.

Ishaaya I，Mendelson Z，Ascher KRS，Casida JE，1987. Cypermethrin synergism by pyrethroid esterase inhibitors in adults of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Pestic. Biochem. Physiol*.，28（2）：155－162.

Lin KJ，Wu KM，Wei HY，Guo YY，2002. Population dynamics of *Bemisia tabaci* on different host plants and its chemical control. *Entomological Knowledge*，39（4）：284－288.［林克剑，吴孔明，魏洪义，郭予元，2002. 烟粉虱在不同寄主作物上的种群动态及化学防治. 昆虫知识，39（4）：284－288］

Morin S，Williamson MS，Goodsons J，Brown JK，Tabashnik BE，Dennehy TJ，2002. Mutations in the *Bemisia tabaci* para sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*，32：1 781－1 791.

Prabhaker N，Coudriet DL，Toscano NC，1988. Effect of synergists on organophosphate and permethrin resistance in a sweetpotato whitefly（Homoptera：Aleyrodidae）. *J. Econ. Entomol*.，81（1）：34－39.

Shen BB，Ren SX，Wu JH，Zhou RC，2004. The influences of several common-used pesticides on *Bemisia tabaci* population. *Journal of South China Agricultural University*，25（1）：40－43.［沈斌斌，任顺祥，吴建辉，周柔昌，2004. 几种常用杀虫药剂对烟粉虱种群数量的影响. 华南农业大学学报，25（1）：40－43］

Soderlund DM，Knipple DC，2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*，33：563－577.

Tan WJ，Wang H，Cao Y，1988. A preliminary study on the insensitivity to decamethrin and change of hydrolase activity of *Aphis gossypii* Glover. *Acta Phytophylacica Sinica*，15（2）：135－138.［谭维嘉，王荷，曹煜，1988. 棉蚜对溴氰菊酯不敏感性与水解酶的变化初探. 植物保护学报，15（2）：135－138］

Tang ZH，Zhou CL，1992. Acetylcholinesterase sensitivity in resistant *Plutella xylostella*（L.）. *Acta Entomol. Sin*.，35（4）：385－392.［唐振华，周成理，1992. 抗性小菜蛾的乙酰胆碱酯酶敏感性. 昆虫学报，35（4）：385－392］

Wang LH，Wu YD，2004. A mutation in sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in *Bemisia tabaci*（Gennadius）and its detection. *Acta Entomologica Sinica*，47（4）：449－453.［王利华，吴益东，2004. 与拟除虫菊酯抗性相关的烟粉虱钠通道基因突变及其检测. 昆虫学报，47（4）：449－453］

Wu YD，Shen JL，Tan FJ，You ZP，1995. Mechanism of fenvalerate resistance in *Helicoverpa armigera* Hübner. *Journal of Nanjing Agricultural University*，18（2）：63－68.［吴益东，沈晋良，谭福杰，尤子平，1995. 棉铃虫对氰戊菊酯抗性机理研究. 南京农业大学学报，18（2）：63－68］

Zheng BZ，Gao XW，Wang ZG，Cao BJ，1988. Preliminary studies of pyrethroid resistance in melon-cotton aphid（*Aphis gossypii* Glov.）in Beijing suburbs and northern region of Hebei province. *Acta Phytophylacica Sinica*，15（1）：55－61.［郑炳宗，高希武，王政国，曹本钧，1988. 北京及河北北部地区瓜-棉蚜对拟除虫菊酯抗性的初步研究. 植物保护学报，15（1）：55－61］

Zhou CL，Tang ZH，Zhang LM，1993. Resistance of diamondback moth to synthetic pyrethroids and its relationship with microsomal mixed-function oxidase. *Acta Phytophylacica Sinica*，20（1）：91－95.［周成理，唐振华，张丽妹，1993. 小菜蛾幼虫对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗药性与多功能氧化酶的关系. 植物保护学报，20（1）：91－95］

（责任编辑：黄玲巧）